

# 紫杉醇联合固体脂质纳米姜黄素对人卵巢癌HO-8910细胞的抑制作用研究

邓舒婷<sup>1\*</sup>, 徐建业<sup>2</sup>, 李蓉<sup>1</sup>, 周琦<sup>1#</sup> (1.重庆市肿瘤研究所妇产科, 重庆 400030; 2.重庆市肿瘤研究所临床检验中心, 重庆 400030)

中图分类号 R285;R737.31 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1756-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.10

**摘要** 目的:研究紫杉醇(PTX)联合固体脂质纳米姜黄素(SLN-Cur)对人卵巢癌HO-8910细胞体外生长的抑制作用。方法:试验分为4组,即阴性对照(仅含正常生产的HO-8910细胞)、PTX(2.5 μmol/L)、SLN-Cur(10 μmol/L)、PTX+SLN-Cur(2.5 μmol/L+10 μmol/L)组。MTT法测定HO-8910细胞增殖抑制率,透射电镜观察HO-8910细胞凋亡超微结构变化,流式细胞仪检测细胞凋亡率与细胞周期分布变化,免疫组化法检测凋亡相关基因蛋白酶的表达。结果:PTX、SLN-Cur、PTX+SLN-Cur均可显著抑制人卵巢癌HO-8910细胞的增殖,其中PTX+SLN-Cur作用最强。与阴性对照组比较,PTX、SLN-Cur、PTX+SLN-Cur组凋亡率显著增加,S期细胞比例逐渐降低,G<sub>2</sub>/M期细胞比例逐渐增高,MMP-9表达减弱,TIMP-2表达增强,其中PTX+SLN-Cur组表现更显著。结论:SLN-Cur对人卵巢癌HO-8910细胞具有较好的体外抑制效果,与PTX联合化疗有增效减毒作用,其机制可能与下调MMP-9表达及上调TIMP-2表达而诱导细胞凋亡有关。

**关键词** 姜黄素;固体脂质纳米粒;紫杉醇;卵巢癌;增殖抑制

## Inhibitory Effect of Curcumin-loaded Solid Lipid Nanoparticles Combined with Paclitaxel on Human Ovarian Cell Line HO-8910

DENG Shu-ting<sup>1</sup>, XU Jian-ye<sup>2</sup>, LI Rong<sup>1</sup>, ZHOU Qi<sup>1</sup> (1.Dept. of Gynaecology and Obstetrics, Chongqing Cancer Research Institute, Chongqing 400030, China; 2.Center for Clinical Laboratory, Chongqing Cancer Research Institute, Chongqing 400030, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study of paclitaxel (PTX) combined with solid lipid nanoparticles of curcumin (SLN-Cur) on the growth inhibition of human ovarian cancer HO-8910 cells *in vitro*. METHODS: The experiment was divided into 4 groups, the negative control (containing only the normal production of HO-8910 cells), PTX (2.5 μmol/L), SLN-Cur (10 μmol/L), PTX+SLN-Cur (2.5 μmol/L+10 μmol/L) group. Determination of inhibitory rate of HO-8910 cell proliferation by MTT method, the ultrastructural changes of apoptosis of HO-8910 cells were observed by transmission electron microscope, and detected the apoptosis rate and cell cycle distribution of flow cytometry, immunohistochemistry method was used to detect the expression of apoptosis related gene protein. RESULTS: PTX, SLN-Cur, PTX+SLN-Cur can significantly inhibit the proliferation of human ovarian cancer HO-8910 cells, in which PTX+SLN-Cur had the strongest effect. Compared with the negative control group, PTX, SLN-Cur, PTX+SLN-Cur group significantly increased, apoptosis rate, the percentage of S phase cells decreased, the percentage of G<sub>2</sub>/M phase cells gradually increased, MMP-9 expression decreased, increased the expression of TIMP-2. The PTX+SLN-Cur group showed more significant. CONCLUSIONS: SLN-Cur had better inhibition effect *in vitro* on human ovarian cancer HO-8910 cells, attenuated synergistic effect in combination with PTX chemotherapy, and to investigate the possible mechanism of MMP-9 expression and up-regulation of TIMP-2 expression and induction of apoptosis.

**KEY WORDS** Curcumin; Solid lipid nanoparticles; Paclitaxel; Ovarian cancer; Anti-proliferation

姜黄素(Curcumin, Cur)是从姜科植物的根茎中提取的一种二苯基庚二酮类化合物,具有降血脂、抗肿瘤、抗凝、抗淀粉酶样蛋白聚合、抑制人类免疫缺陷病毒(HIV)-1整合酶活性等作用<sup>[1]</sup>,特别是其抗肿瘤作用日益为人们所关注。国内、外众多学者对姜黄素的抗肿瘤作用及其机制做了大量研究,证实姜黄素可抑制多种肿瘤细胞生长<sup>[2-3]</sup>。近年来研究发现<sup>[4]</sup>,将姜黄素制备成固体脂质纳米姜黄素(SLN-Cur)新型亚微粒给药系统,可提高药物在体内的生物利用度,延长其在血液中的半衰

期,更好地发挥药效,且对正常细胞基本无毒性。紫杉醇(Paclitaxel, PTX)是治疗卵巢癌常用的化疗药物。本研究制备SLN-Cur并观察其与PTX联用对人卵巢癌HO-8910细胞的抑制作用,为SLN-Cur应用于卵巢癌的临床治疗提供一定的理论基础。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

NU-425-300型超净台、CO<sub>2</sub>孵育箱(美国Nu Aire公司);IX71型倒置显微镜(日本Olympus公司);HT7700型透射电镜(日本日立公司);ELX800型酶标仪(美国Bio Tek公司)。

#### 1.2 药品与试剂

Cur(美国Sigma公司,批号:100K3447,规格:250 mg/瓶,

\* 医师, 硕士。研究方向: 妇科肿瘤。E-mail: judysutindeng@yahoo.com.cn

# 通信作者: 教授, 硕士研究生导师。研究方向: 妇科肿瘤临床与基础, 肿瘤早期诊断与耐药逆转。E-mail: qizhou9128@163.com

纯度:99%);PTX原料药(批号:19994036)、PTX注射液(批号:19994040,规格:30 mg/瓶)均购自太极集团药业股份有限公司;青霉素注射用无菌粉末(批号:BO501013)、链霉素注射用无菌粉末(批号:BO50310)均购自华北制药集团有限责任公司;空白固体脂质纳米粒(SLN-F)、SLN-Cur由重庆市肿瘤研究所临检中心分子生物学实验室制备;10%小牛血清(兰州民海生物工程有限公司,批号:20091015)。

### 1.3 细胞

人卵巢癌HO-8910细胞系由重庆医科大学肿瘤学教研室惠赠,由重庆市肿瘤研究所临检中心分子生物学实验室贮藏。

## 2 方法

### 2.1 SLN-Cur的制备

利用改良微乳法制备SLN-Cur。称取20 mg姜黄素,脂质、卵磷脂各10 ml制得有机相,另取处方量的表面活性剂加入30 ml双蒸水中构成水相。在(75±2)℃水浴中将有机相匀速加入水相,恒温搅拌形成微乳,挥干有机溶剂并浓缩至5 ml,将所得半透明乳液快速分散于另一0~2℃的10 ml冰水浴中继续搅拌固化0.5 h,经0.8 μm微孔滤膜滤过,即制得SLN-Cur,4℃贮藏,备用。SLN-F与SLN-Cur均采用可用于人体的无毒副作用药物制剂制备,本身安全合格、无毒(已由预试验得出)。

### 2.2 细胞培养

人卵巢癌HO-8910细胞系培养在RPIM-1640培养液中(培养液中含10%小牛血清、100 u/ml青霉素、100 u/ml链霉素),于37℃下5% CO<sub>2</sub>饱和湿度孵箱中贴壁生长。0.25%胰酶消化,2~3 d传代。

### 2.3 分组

试验设阴性对照(仅含正常生长的HO-8910细胞)、PTX(2.5 μmol/L)、SLN-Cur(10 μmol/L)与PTX+SLN-Cur(2.5 μmol/L+10 μmol/L)组。每组设4个复孔,另设仅加培养液的空白孔以调零。

### 2.4 PTX+SLN-Cur对人卵巢癌HO-8910细胞增殖的抑制作用

取对数生长期的人卵巢癌HO-8910细胞常规消化,调整成分子浓度为 $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 的悬液,种植于96孔细胞培养板中,按“2.3”项下方法设置给药浓度。置37℃、5% CO<sub>2</sub>孵箱内培养24 h后收集,弃原液,每孔加无血清培养液200 μl与5 mg/ml MTT 20 μl继续培养,孵育4 h,测试结束前加入DMSO 200 μl,在摇床上震荡10 min,待结晶溶解后置入酶标仪,于540 nm波长处测每孔吸光度(A)值,按下式计算抑制率(fa)、存活率(fu): $fa = (1 - \text{试验组}A / \text{阴性对照组}A) \times 100\%$ ;  $fu = (\text{试验组}A / \text{阴性对照组}A) \times 100\%$ 。试验重复3次,取平均值。

### 2.5 透射电镜观察药物作用后人卵巢癌HO-8910细胞超微结构改变

细胞处理同“2.4”项下方法,培养24 h后用PBS洗2次,2.5%戊二醛固定,2%四氧化锇再次固定。脱水,包埋,切片和染色均按常规处理,透射电镜观察,拍照。

### 2.6 流式细胞仪分析人卵巢癌HO-8910细胞周期与凋亡

取分子浓度为 $5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 的悬液接种于200 ml培养瓶内,分组与给药同“2.3”项下方法,培养24 h后消化收集各组细胞,

PBS洗2次,转至1.5 ml离心管中,3 000 r/min离心3 min,弃上清液,加入1 ml含10%小牛血清的PBS液混匀;用预冷75%乙醇固定并吹打成单细胞悬液,4℃放置30 min,1 000 r/min离心20 min;加PBS后再次离心,去除固定液,用流式细胞仪检测细胞凋亡及周期分布,采用Modifit 1.0软件分析结果。

### 2.7 免疫组化法检测人基质金属蛋白酶(MMP)-9与人基质金属蛋白酶抑制因子(TIMP)-2的表达

细胞分组与处理同“2.4”项下方法,培养24 h, PBS洗5 min,反复3次,95%酒精固定20 min,按照试剂盒说明书操作,以PBS代替一抗作阴性对照,显微镜下观察并照相,以胞浆中有明显DAB棕黄色染色者判断为阳性(抗体阳性部位均在胞浆)。采用image pro plus6.0生物医学图像分析软件系统进行图像分析,测定其累计光密度值(LA)及区域面积(Area),计算平均光密度值(MA)=LA/Area,以反映细胞中各种待测蛋白的表达水平。

### 2.8 统计学方法

采用SPSS13.0统计软件进行统计分析,所测数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 PTX+SLN-Cur对人卵巢癌HO-8910细胞增殖的抑制作用

SLN-F对HO-8910细胞几乎无毒性作用(细胞抑制率<4%),可忽略其对细胞的毒性作用,表明用于本试验是安全合格的(已由预试验得出)。PTX+SLN-Cur组的抑制率较PTX组与SLN-Cur组显著增加( $P < 0.01$ ),药物效应显著提高,提示PTX与SLN-Cur二药合用,具有明显的协同作用。PTX+SLN-Cur对人卵巢癌HO-8910细胞增殖的抑制作用见表1。

表1 PTX+SLN-Cur对人卵巢癌HO-8910细胞增殖的抑制作用

Tab 1 Inhibitory effect of PTX+SLN-Cur on the growth of human ovarian cancer cell line HO-8910

组别	抑制率, %
SLN-Cur组	0.161 5±0.003 9
PTX组	0.121 6±0.003 2
PTX+SLN-Cur组	0.374 2±0.008 4*

与SLN-Cur组或PTX组比较: \* $P < 0.01$

vs. SLN-Cur group or PTX group: \* $P < 0.01$

### 3.2 PTX+SLN-Cur对人卵巢癌HO-8910细胞凋亡与周期分布的影响

#### 3.2.1 PTX+SLN-Cur对人卵巢癌HO-8910细胞凋亡率的影响

PTX、SLN-Cur与PTX+SLN-Cur作用于人卵巢癌HO-8910细胞的凋亡率分别为(4.52±1.02)%、(8.69±3.18)%、(17.86±3.23)%。PTX+SLN-Cur组的细胞凋亡率是阴性对照组的6.5倍,分别是PTX组和SLN-Cur组的3.9、2.1倍,显著高于两药单独处理组( $P < 0.05$ )。PTX+SLN-Cur对人卵巢癌HO-8910细胞凋亡的影响见表2。

#### 3.2.2 PTX+SLN-Cur对人卵巢癌HO-8910细胞周期分布的影响

阴性对照组DNA方图为典型肿瘤细胞G1、S、G2峰型,各药分别作用24 h后,与阴性对照组比较,各组均出现S期细胞

比例逐渐降低, G<sub>2</sub>/M期细胞比例逐渐增高; PTX+SLN-Cur较分别单用PTX和SLN-Cur发生G<sub>2</sub>/M期阻滞、诱导细胞凋亡的作用更显著。PTX+SLN-Cur对人卵巢癌HO-8910细胞周期分布与凋亡的影响见表2。

表2 PTX+SLN-Cur对人卵巢癌细胞HO-8910细胞周期分布与凋亡的影响

Tab 2 Effects of PTX+SLN-Cur on cell cycle and the apoptosis rate of human ovarian cancer cell line HO-8910

组别	细胞周期分布, %			凋亡率, %
	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	
阴性对照组	56.85	35.94	7.21	2.75 ± 0.26
PTX组	50.34	34.30	15.36*	4.52 ± 1.02*
SLN-Cur组	51.52	31.86	16.62*	8.69 ± 3.18*
PTX+SLN-Cur组	52.46	25.85	21.70**	17.86 ± 3.23**

与阴性对照组比较: \*P<0.05; \*\*P<0.01

vs. negative control group: \*P<0.05; \*\*P<0.01

### 3.3 PTX+SLN-Cur对人卵巢癌HO-8910细胞超微结构的影响

阴性对照组细胞形态较幼稚, 可见细胞表面有较多微绒毛, 核大, 形态不规则, 核仁发达, 甚至多个, 线粒体散在分布; PTX组及SLN-Cur组均可见细胞表面微绒毛减少, 细胞内出现较多脂滴, 且SLN-Cur组出现细胞核固缩; PTX+SLN-Cur组可见细胞内有大量脂滴, 出现线粒体肿胀, 并可见到凋亡小体。细胞凋亡超微结构图见图1。

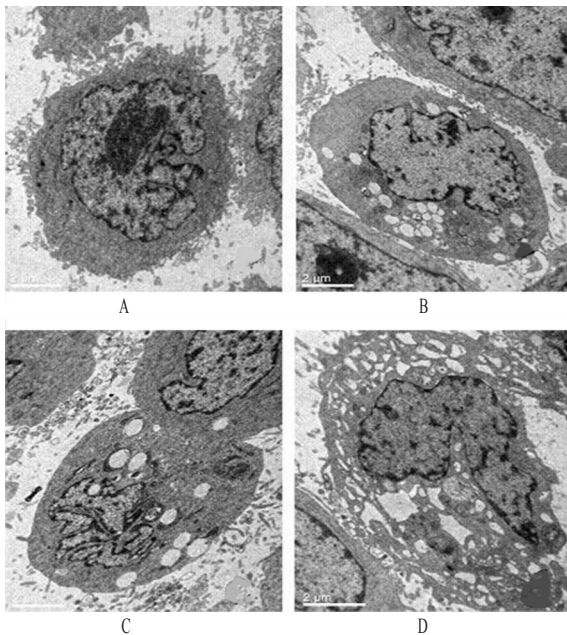


图1 细胞凋亡超微结构图

A. 阴性对照组; B. PTX组; C. SLN-Cur组; D. PTX+SLN-Cur组

Fig 1 Ultrastructure observation of cell apoptosis

A. negative control group; B. PTX group; C. SLN-Cur group; D. PTX+SLN-Cur group

### 3.4 PTX+SLN-Cur对人卵巢癌HO-8910细胞MMP-9与TIMP-2表达的影响

与阴性对照组比较, PTX、SLN-Cur与PTX+SLN-Cur组的MMP-9表达显著减弱(P<0.05), 且PTX+SLN-Cur组最显著;

PTX组、SLN-Cur组与PTX+SLN-Cur组的TIMP-2表达均显著增强(P<0.05), 且PTX+SLN-Cur组增强最显著。免疫组化测定MMP-9、TIMP-2的表达分别见表3、图2、图3。

表3 免疫组化法测定MMP-9、TIMP-2的表达

Tab 3 The expression of MMP-9 and TIMP-2 by immunocytochemical method

组别	MMP-9	TIMP-2
阴性对照组	0.269 ± 0.041	0.098 ± 0.010
PTX组	0.224 ± 0.024*	0.155 ± 0.021*
SLN-Cur组	0.188 ± 0.026*	0.169 ± 0.019*
PTX+SLN-Cur组	0.128 ± 0.012*	0.246 ± 0.048*

与阴性对照组比较: \*P<0.05

vs. negative control group: \*P<0.05

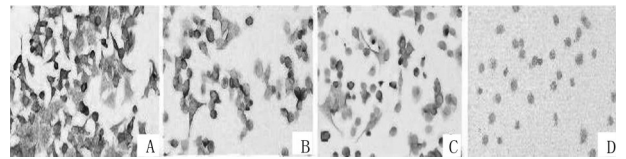


图2 免疫组化法测定MMP-9的表达(200×)

A. 阴性对照组; B. PTX组; C. SLN-Cur组; D. PTX+SLN-Cur组

Fig 2 The expression of MMP-9 by immunocytochemical method(200×)

A. negative control group; B. PTX group; C. SLN-Cur group; D. PTX+SLN-Cur group

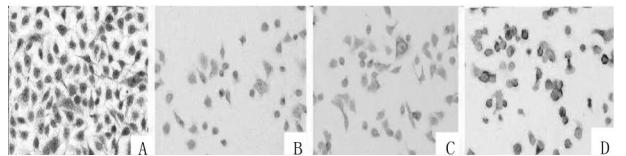


图3 免疫组化法测定TIMP-2的表达(200×)

A. 阴性对照组; B. PTX组; C. SLN-Cur组; D. PTX+SLN-Cur组

Fig 3 The expression of TIMP-2 by immunocytochemical method(200×)

A. negative control group; B. PTX group; C. SLN-Cur group; D. PTX+SLN-Cur group

## 4 讨论

卵巢癌是妇科三大恶性肿瘤之一, 由于卵巢位于盆腔深处, 故卵巢癌早期症状不明显, 发现时多处于中晚期, 手术治疗效果欠佳, 化疗是其重要的治疗手段<sup>[5]</sup>。目前, 临床常用的抗肿瘤化疗药物选择性较差, 毒副作用大, 存在较严重的骨髓抑制、神经毒性、肾脏毒性、胃肠道反应等不良反应, 且易产生获得性耐药, 导致化疗失败, 癌症复发或转移。因此, 寻找能增进疗效并减少毒性的化疗药物及化疗方案, 是提高卵巢癌患者生存率的关键<sup>[6]</sup>。

中药姜黄提取物姜黄素, 具有抗肿瘤、保肝、降血脂等多种药理作用<sup>[7-9]</sup>, 且几乎无毒性, 对正常组织细胞不产生不良影响<sup>[10]</sup>, 近年来其抗肿瘤作用成为研究热点。体内、外实验证实, 姜黄素具有抑制肿瘤细胞增殖, 促进凋亡等作用<sup>[11]</sup>。其抗癌谱广且毒副作用小, 有望成为一种新型抗肿瘤药物。但由于其不溶于水, 耐热性及稳定性较差, 限制了作为抗癌新药的研制进展及临床应用。SLN是一种粒径在10~1000 nm之间的

新型亚微胶体给药系统,自 Wissing SA 等<sup>[12]</sup>第一次提出 SLN 以来,其作为一种新型的药物载体备受关注。目前 SLN 有多种制备方法,如高压乳匀法、薄膜超声法、微乳法等<sup>[13]</sup>。本文采用改良微乳法制备较简单,粒径足够小,既适于实验室研制,也比较容易规模化生产。Cur 与 SLN 结合,具有生物相容性好,良好靶向性等优势,同时可避免有机溶剂不能完全去除的缺点,完全可以替代脂质体、聚合物纳米粒等传统剂型<sup>[14-15]</sup>。已有相关研究显示,SLN-Cur 较普通制剂有较高的载药量及包封率,水溶性及稳定性均有所提高。

本研究发现,SLN-Cur 与 PTX 均对人卵巢癌 HO-8910 细胞系有明显的增殖抑制作用,且 PTX+SLN-Cur 的抑制率较单用 PTX 或 SLN-Cur 均明显增加。

阻滞细胞周期及诱导细胞凋亡是 PTX 等化疗药物抑制肿瘤细胞增殖的重要机制。本研究结果显示,SLN-Cur 与 PTX 均可使人卵巢癌细胞系 HO-8910 发生 G<sub>2</sub>/M 期阻滞,抑制肿瘤细胞增殖,两药联用抑制增殖作用更显著。研究结果表明,SLN-Cur 和 PTX 单独及联合作用于人卵巢癌 HO-8910 细胞系均可起到诱导凋亡作用,且两药联合应用时凋亡率显著增高,这与 MTT 检测结果相符。以上结果提示,SLN-Cur 可能增强 PTX 对肿瘤细胞诱导凋亡作用,机制可能为 SLN-Cur 的载体成分同细胞膜的生理相容性好,增加了药物对细胞膜的透过性及被肿瘤细胞的摄取量<sup>[16]</sup>,药物进入细胞后阻滞细胞周期停滞于 G<sub>2</sub>/M 期。免疫组化法显示,药物组 MMP-9 表达较阴性对照组减弱,PTX+SLN-Cur 组减弱最显著;TIMP-2 表达增强,PTX+SLN-Cur 组增强最显著。据上述结果,结合流式细胞仪检测分析可知,SLN-Cur 进入细胞后产生卵巢癌细胞周期 G<sub>2</sub>/M 期停滞的原因为其抑制细胞的 G<sub>2</sub>/M 有丝分裂期,既抑制了细胞增殖,同时促进了细胞的凋亡。

本研究表明,SLN-Cur 与 PTX 联合应用治疗卵巢癌时,既能通过提升 PTX 的抗肿瘤效果来克服肿瘤对化疗药物的耐受性,又可通过减低 PTX 的使用剂量而克服化疗药的毒副作用。本研究结果为 Cur 抗肿瘤的进一步开发应用,为临床上卵巢癌化疗时减少 PTX 用量,降低 PTX 毒性及耐药性,提高化疗效果提供新思路及一定的依据。

### 参考文献

[1] 冯为,胡林峰.姜黄素的研究进展及其抗肿瘤作用概况[J].中国现代药物应用,2011,5(13):117.  
[2] Inaro H, Onada M, Inafuku N, et al. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary morigenesis in rats[J]. *Carcinogenesis*,2000,21(10): 1 835.  
[3] 林海,李晓辉.莪术醇诱导白血病 L1210 细胞凋亡作用研

究[J].中国药房,2008,19(30):2 328.

[4] Manjunath K, Reddy JS, Venkateswarlu V. Solid Lipid nanoparticles as drug delivery systems[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*,2005,27(2):127.  
[5] 李瑞萍,胡雪梅,吕银凤,等.苦参碱对人卵巢癌细胞增殖的影响及其机制[J].西安交通大学学报,2010,31(5): 621.  
[6] 张正茂,顾来梅,刘洁,等.手霉素对人卵巢癌 3AO 细胞增殖和凋亡的影响[J].肿瘤,2010,30(8):651.  
[7] Cascorbi I, Haenisch S. Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters and clinical implications[J]. *Methods Mol Biol*,2010(596):95.  
[8] Ding XW, Wu JH, Jiang CP. ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy[J]. *Life Sci*,2010,86(17/18):631.  
[9] Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis[J]. *Cell Death Differ*,2008,15(4): 678.  
[10] Anand P, Sundaram C, Jhurani S, et al. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution [J]. *Cancer Lett*,2008,267(1):133.  
[11] Jing Z, Yong Z, Yan Z, et al. Anti-tumor effect of curcumin on human cervical carcinoma HeLa cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Chinese J Cancer Res*,2007,19(1):32.  
[12] Wissing SA, Kayser O, Muller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery[J]. *Adv Drug Delivery Rev*,2004,56(9):1 257.  
[13] 马艳,蒋学华,杨安东,等.薄膜超声法制备姜黄素固体脂质纳米粒的工艺研究[J].中成药,2008,30(7):981.  
[14] Worle G, Siekmann B, Bunjes H. Effect of drug loading on the transformation of vesicular into cubic nanoparticles during heat treatment of aqueous monoolein / poloxamer dispersions[J]. *Eur J Pharm Biopharm*,2006,63(2):128.  
[15] Hu FQ, Jiang SP, Du YZ, et al. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system[J]. *Colloids Surf B: Biointerfaces*,2005,45(3/4):167.  
[16] 姜浩,樊光华.人参皂苷-Rh2 对人肝癌 Bel-7404 细胞增殖和凋亡的影响[J].中国肿瘤临床与康复,2004,11(4): 289.

(收稿日期:2012-12-17 修回日期:2013-03-11)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅